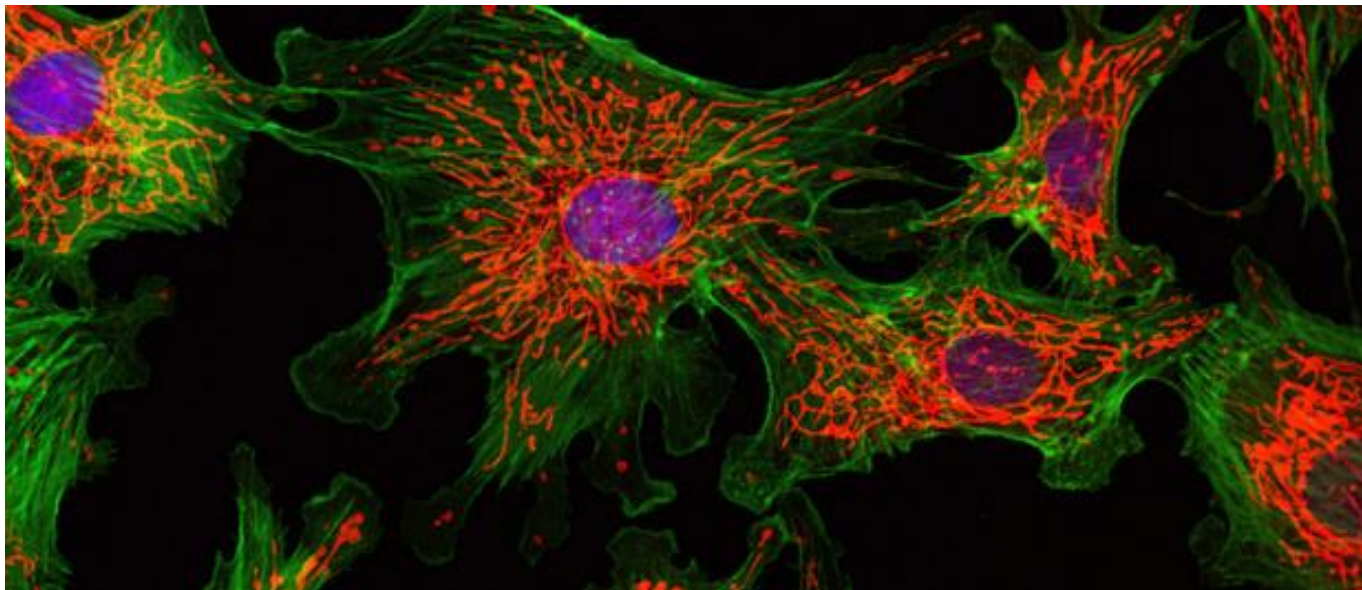


# Μικροσκοπία φθορισμού I

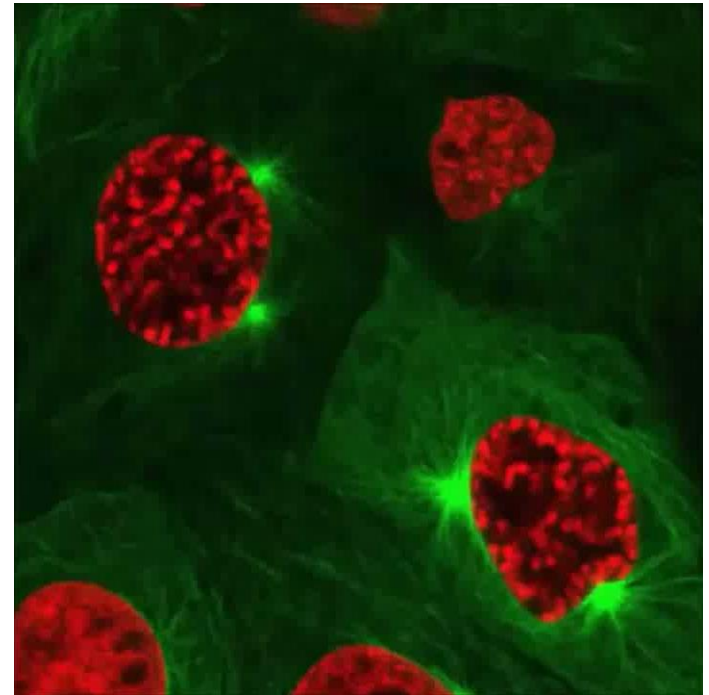


# Γιατί να χρησιμοποιήσω φθορισμό;

Μιτωτική διαίρεση σε επιθηλιακά κύτταρα  
μέσω απεικόνισης φθορισμού

**Η μικροσκοπία φθορισμού προσφέρει:**

- Υψηλή απεικονιστική αντίθεση
- Υψηλή επιλεκτικότητα απεικόνισης
- Ποσοτικοποίηση πληροφορίας
- Δυνατότητα in-vivo απεικόνισης



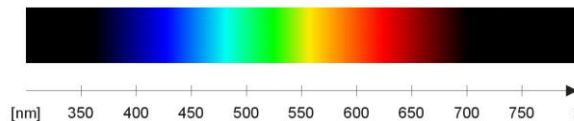
<https://www.youtube.com/watch?v=TKKdxzHVK2w>

# Τί είναι φθορισμός;

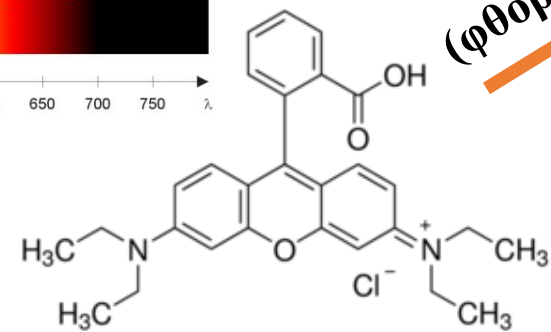
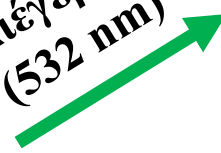
- Φθορισμός ονομάζεται η εκπομπή φωτός από μια ουσία που έχει απορροφήσει φως ή άλλου είδους ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.
- Στις περισσότερες περιπτώσεις που αφορούν βιολογικές παρατηρήσεις, το εκπεμπόμενο φως φθορισμού έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος, και άρα μικρότερη ενέργεια σε σχέση με την απορροφούμενη ακτινοβολία.



Εκπομπή φθορισμού από διάφορα διαλύματα μέσω διέγερσης με UV φως



Διέγερση  
(532 nm)

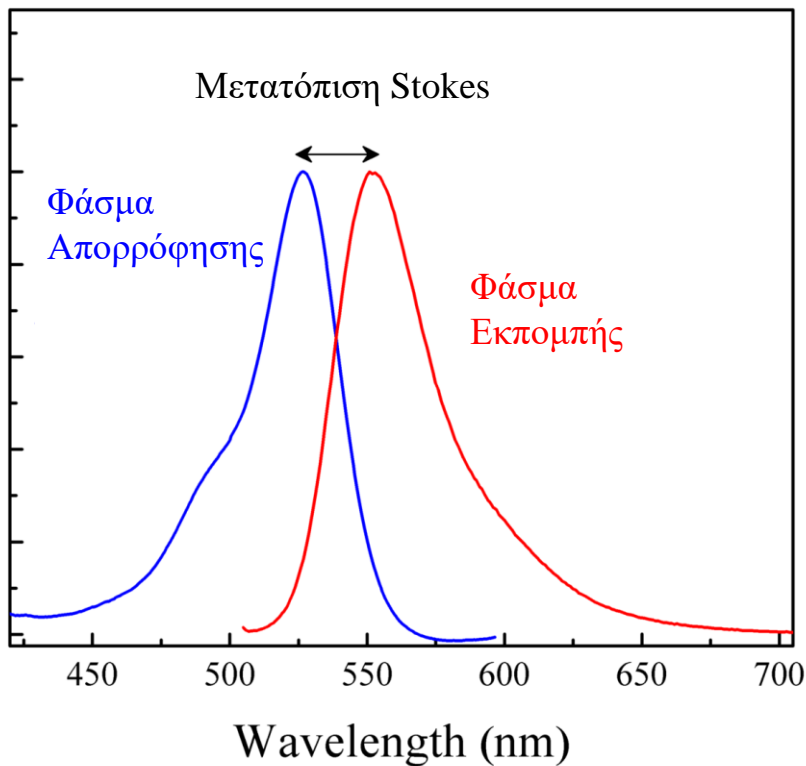


Μόριο Ροδαμίνης Β

Εκπομπή  
(φθορισμός)



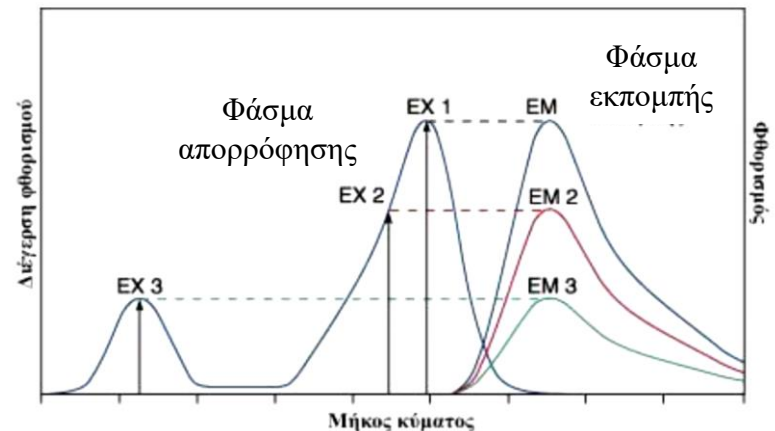
# Η μετατόπιση Stokes στις διεργασίες φθορισμού



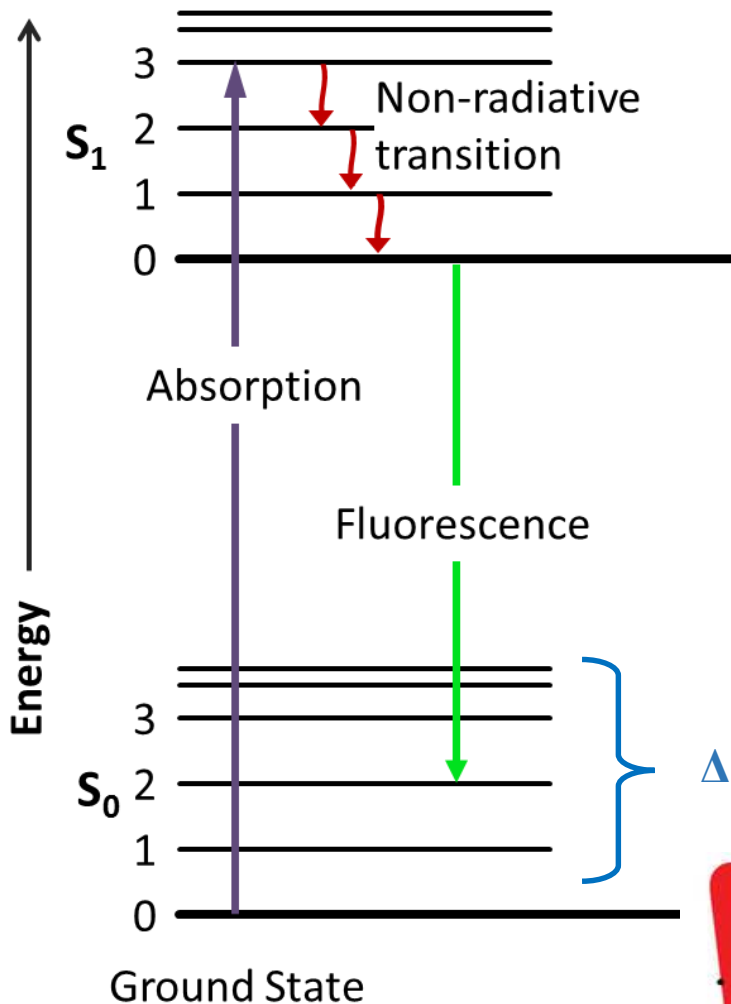
- Μετατόπιση Stokes ονομάζεται η διαφορά στα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού μιας ουσίας
- Το φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι σχεδόν κατοπτρικό συγκριτικά με το αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης
- Το σχήμα του φάσματος εκπομπής φθορισμού είναι ανεξάρτητο του μήκους κύματος διέγερσης
- Αντίθετα, η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης



Γιατί προκύπτει η ενεργειακή διαφορά μεταξύ φωτονίων φθορισμού και φωτονίων διέγερσης; Που χάνεται η ενέργεια;



# Το διάγραμμα Jablonski για φθορισμό



Χρόνος απορρόφησης:  
 $\sim 1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s} \rightarrow 0.3 \mu\text{m}$

Χρόνος δονητικής  
αποδιέγερσης:  
 $\sim 1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s} \rightarrow 0.3 \text{ mm}$

Χρόνος ηλεκτρονιακής  
αποδιέγερσης:  
 $\sim 10 \text{ ns} = 10^{-8} \text{ s} \rightarrow 3 \text{ m}$

Κβαντική απόδοση  
φθοροφόρου:

Φωτόνια φθορισμού

Φωτόνια απορρόφησης

Συνεπώς:

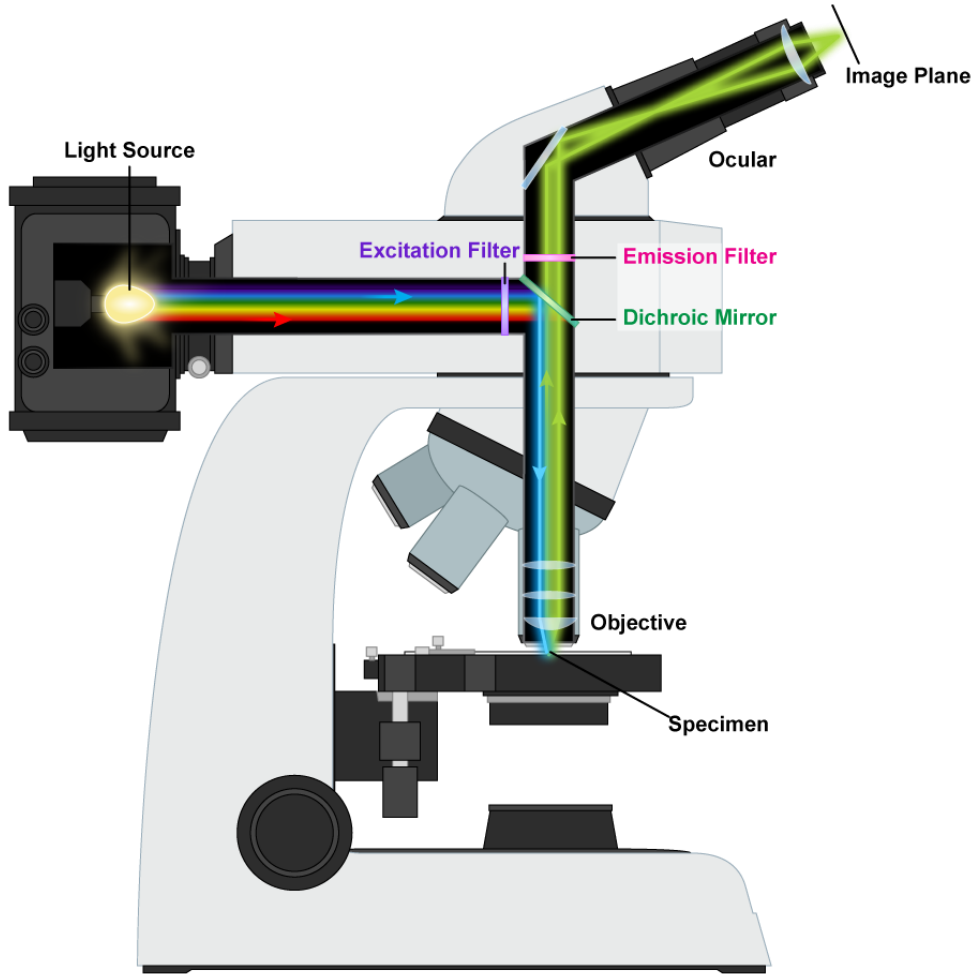
Η εκπομπή φθορισμού θα εξαρτάται α) από το συντελεστή απορρόφησης για συγκεκριμένο μήκος κύματος και β) τη κβαντική απόδοση

Δονητικές στάθμες



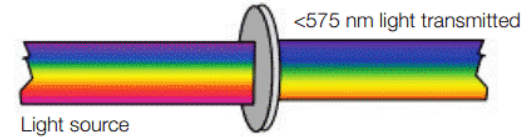
Μέρος της ενέργειας των φωτονίων διέγερσης μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω των μη ακτινοβολητικών διαδικασιών με αποτέλεσμα τα φωτόνια φθορισμού να έχουν μεγαλύτερα μήκη κύματος και μικρότερες ενέργειες (Stokes shift)

# Το μικροσκόπιο φθορισμού

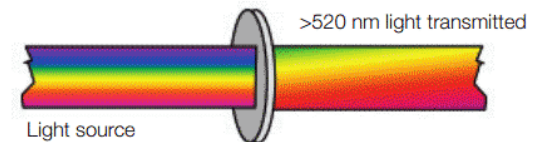


## Είδη φίλτρων / διχροϊκών

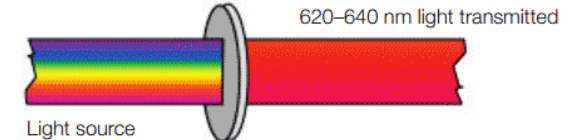
575 nm Short Pass Filter



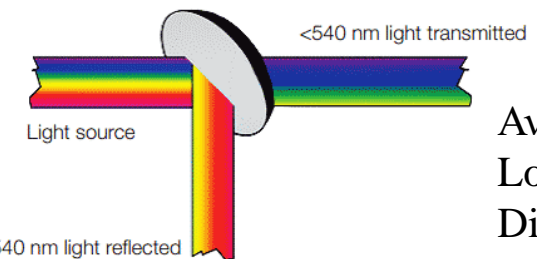
520 nm Long Pass Filter



630/20 nm Band Pass Filter



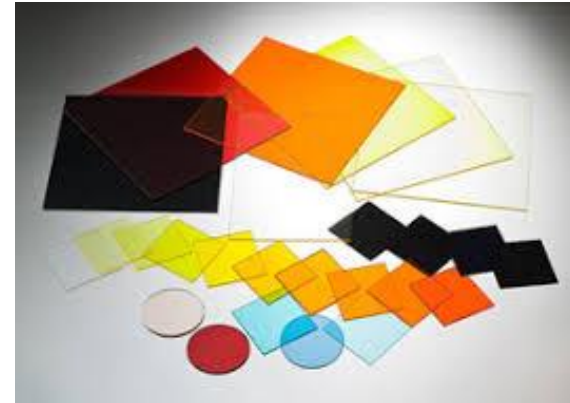
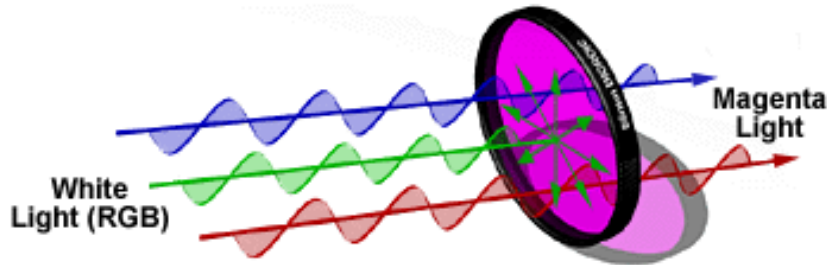
540 nm Dichroic Short Pass Mirror



Αντίστοιχα,  
Long Pass  
Dichroics!

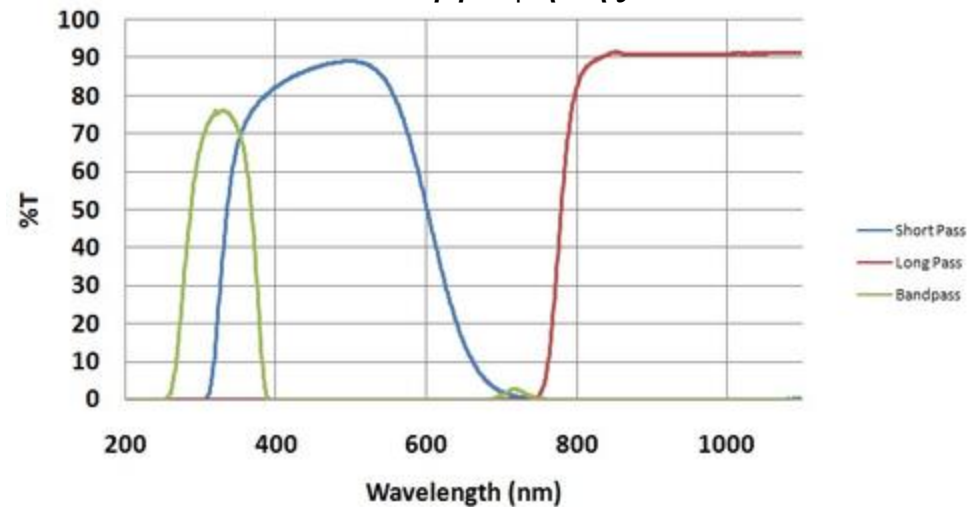
# Τεχνολογίες οπτικών φίλτρων

## Φίλτρα απορρόφησης



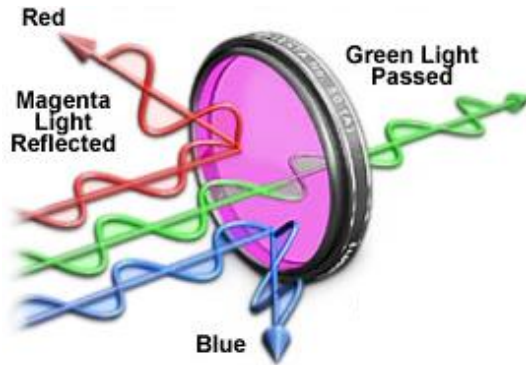
- Τα φίλτρα αυτά επιτρέπουν τη διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος, απορροφώντας τα μη επιθυμητά
- Αποτελούνται τυπικά από βαμμένο γυαλί (color glass) και είναι σχετικά φτηνά στο να κατασκευαστούν
- Η απορρόφηση ελέγχεται ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση της χρωστικής
- Δεν είναι κατάλληλα για εφαρμογές που απαιτούν ακρίβεια

## Διαπερατότητα τυπικών φίλτρων απορρόφησης

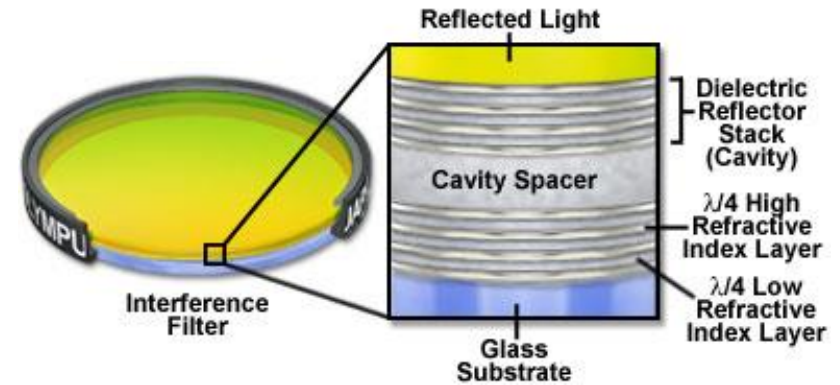


# Τεχνολογίες οπτικών φίλτρων

## Φίλτρα συμβολής



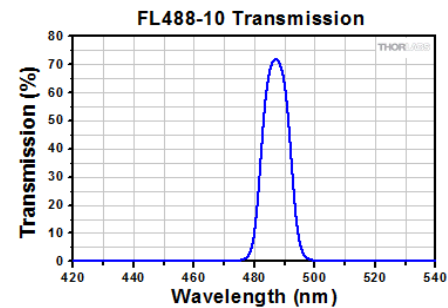
## Anatomy of an Interference Filter



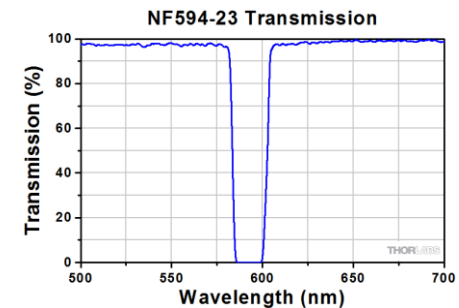
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/filters/interference/>

- Τα διχροϊκά φίλτρα βασίζουν τη λειτουργία τους σε μια σειρά διαδοχικών λεπτών στρωμάτων χαμηλού και υψηλού δείκτη διάθλασης
- Όταν το πάχος του διαχωριστικού στρώματος (spacer) γίνει  $\lambda/2$ , προκύπτει ενισχυτική συμβολή για το επιθυμητό μήκος κύματος διέλευσης  $\lambda$ , ενώ η υπόλοιπη ακτινοβολία ανακλάται πίσω
- Σε σχέση με τα φίλτρα απορρόφησης, τα φίλτρα συμβολής παρουσιάζουν μεγάλη ακρίβεια στη φασματική επιλεκτικότητα

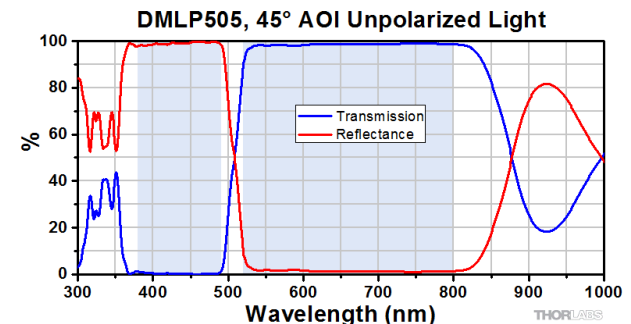
## Φίλτρο Bandpass



## Φίλτρο Notch

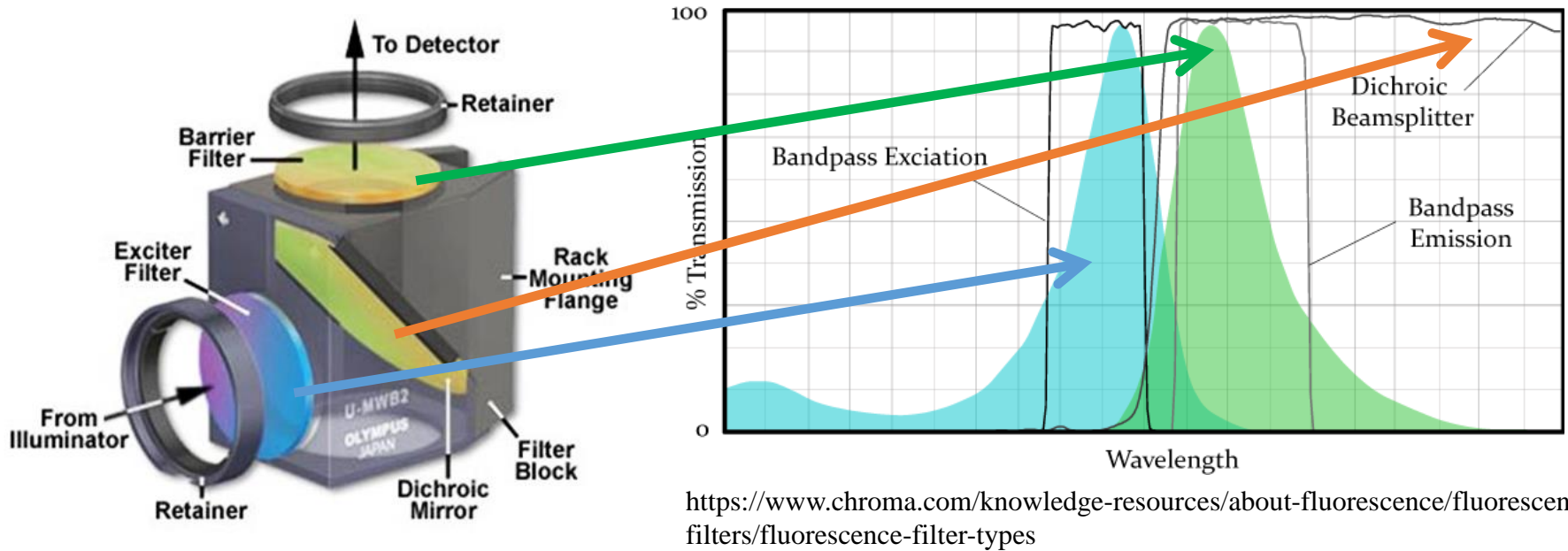


## Διχροϊκός Longpass





# Περιγραφή του filter cube



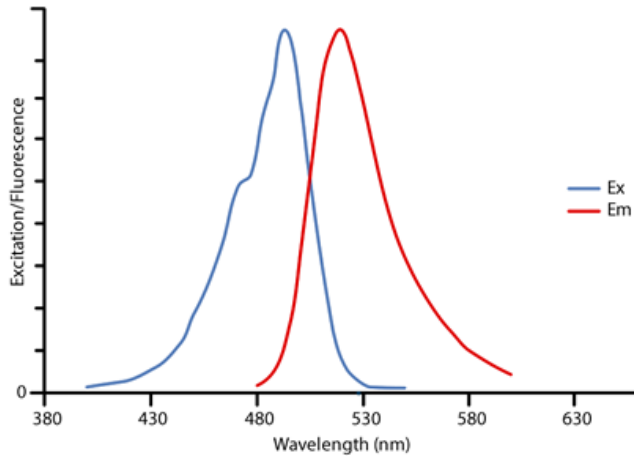
Το filter cube αποτελείται από τρία βασικά οπτικά στοιχεία τα οποία είναι τοποθετημένα σε μία διάταξη:



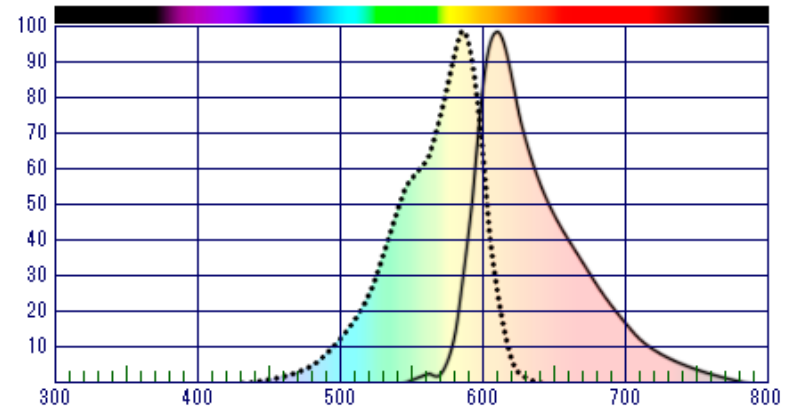
- α) το φίλτρο διέγερσης (Excitation filter) επιτρέπει τη διέλευση συγκεκριμένων μηκών κύματος για τη διέγερση του φθοροφόρου
- β) το φίλτρο εκπομπής (Emission filter) επιτρέπει τη διέλευση μόνο των εκπεμπόμενων μηκών κύματος φθορισμού
- γ) το διχροϊκό κάτοπτρο (Dichroic mirror) διαχωρίζει τα διεγείροντα από τα εκπεμπόμενα μήκη κύματος

# Παραδείγματα συνδυασμών φίλτρων

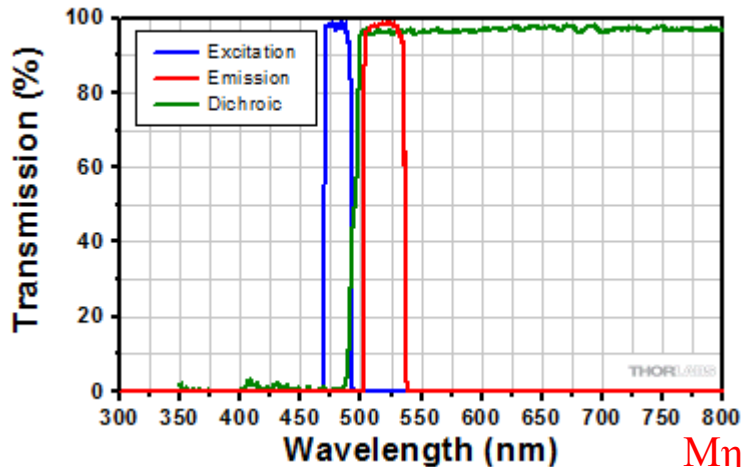
## GFP Alexa Fluor 488



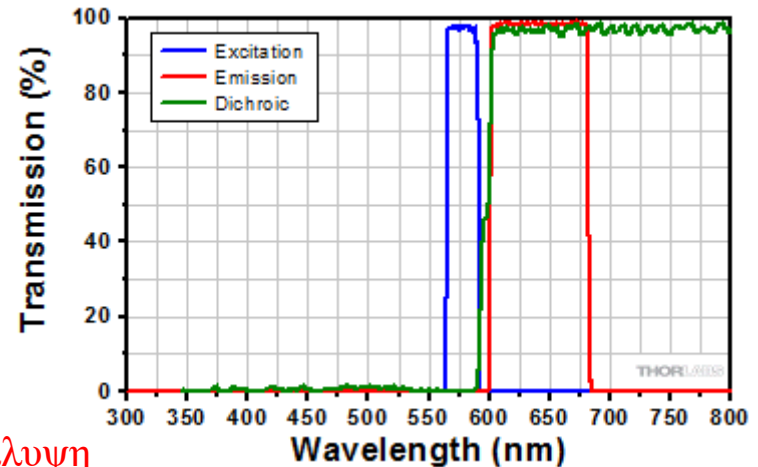
## mCherry



## MDF-GFP2 Transmission



## MDF-MCHA Transmission



Μη αλληλεπικάλυψη  
φασματικών περιοχών

Διέγερση:  $482 \pm 9$  nm

Εκπομπή:  $520 \pm 14$  nm

Διέγερση:  $578 \pm 10.5$  nm

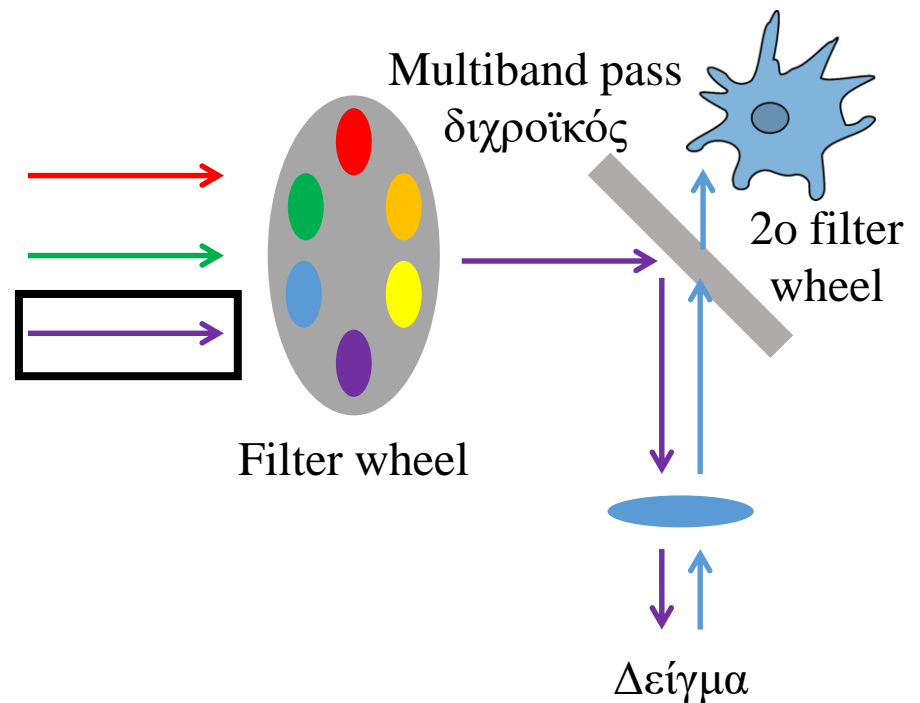
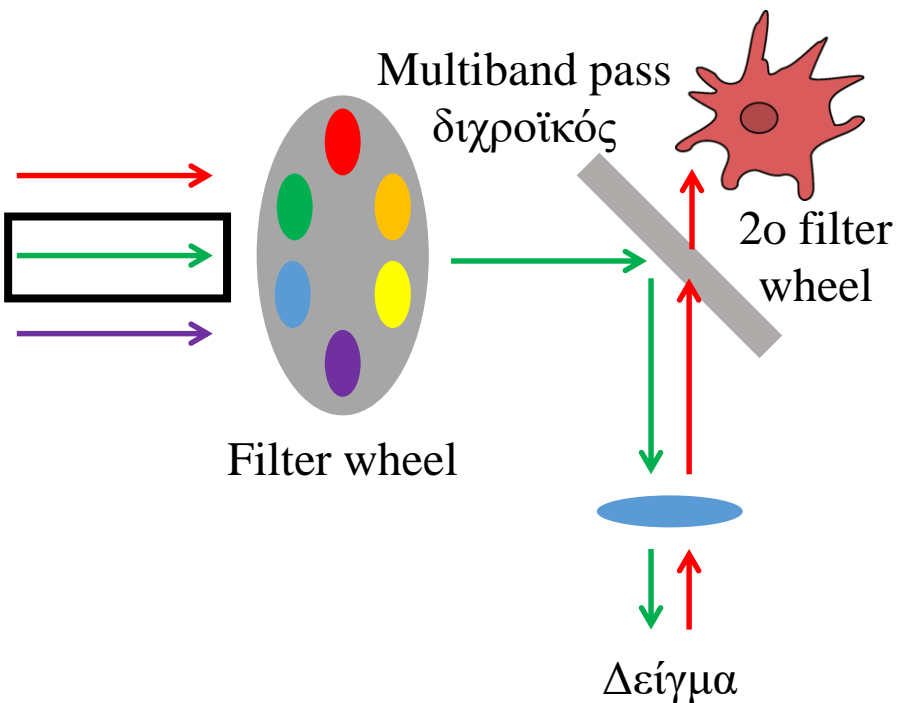
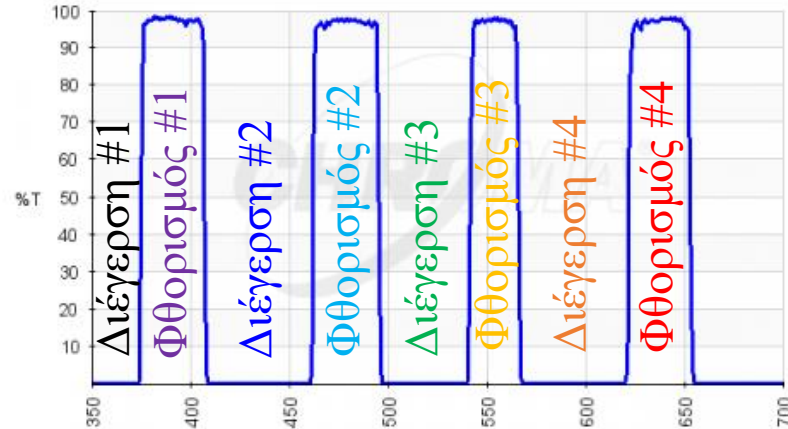
Εκπομπή:  $641 \pm 37.5$  nm

# Γρήγορη αλλαγή μηκών κύματος

Motorized filter wheel



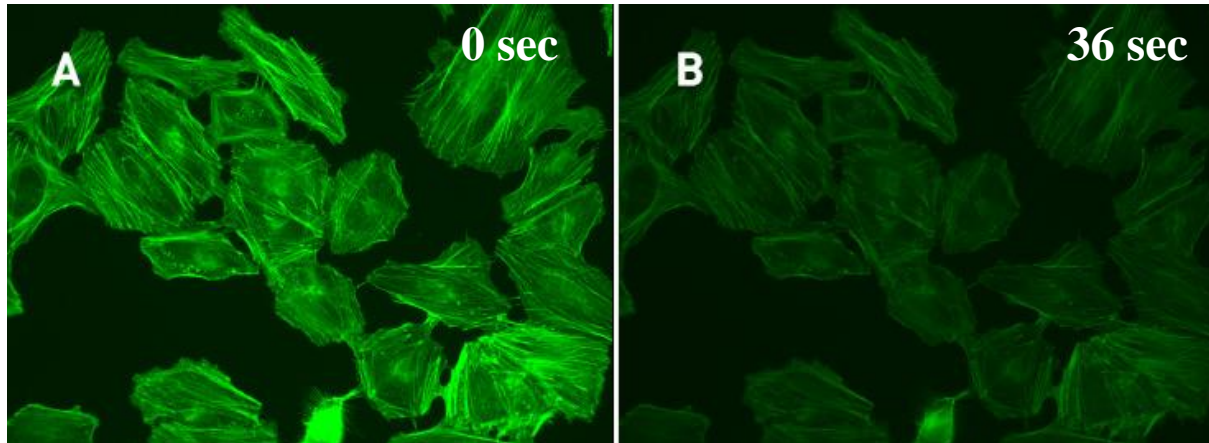
Διαπερατότητα multiband pass διχροϊκού



# Το πρόβλημα της φωτολεύκανσης (photobleaching)



Η φωτολεύκανση είναι η μη αναστρέψιμη καταστροφή ενός διεγερμένου φθοροφόρου λόγω φωτοχημικών μεταβολών των μορίων έπειτα από παρατεταμένη έκθεση στην ακτινοβολία

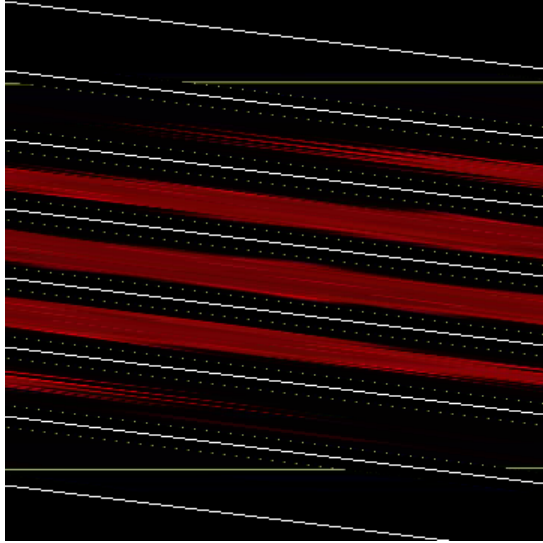


## Αντιμετωπίζεται με:

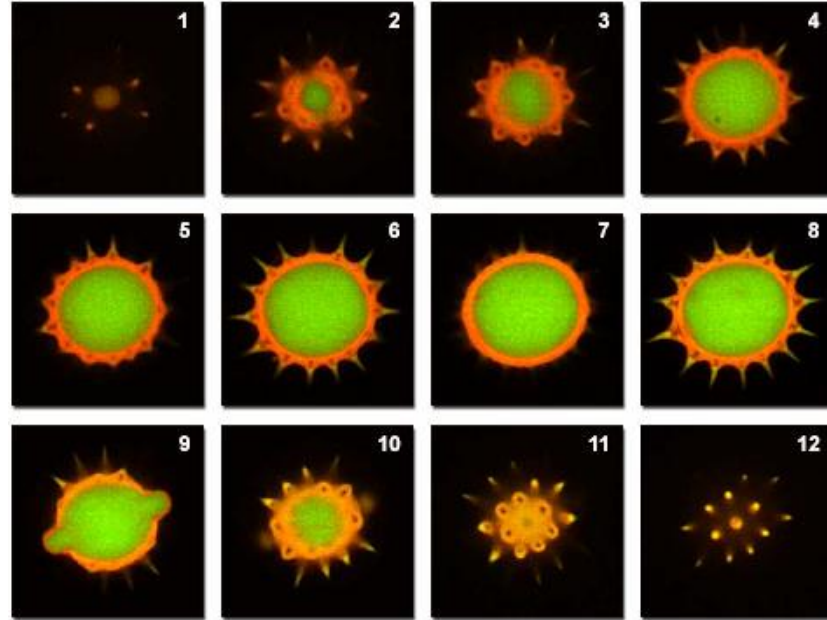
- Επιλογή ανθεκτικών φθοροφόρων
- Σήμανση με μεγάλη πυκνότητα φθοροφόρου
- Αφαίρεση μοριακού οξυγόνου από το δείγμα (π.χ. χρήση γλυκερόλης, ή ενζυματικών συστημάτων)
- Διέγερση δείγματος μόνο κατά την παρατήρηση
- Ελαχιστοποίηση χρόνου έκθεσης κάμερας και έντασης διέγερσης

# 3-Δ ανακατασκευή εικόνας μέσω φθορισμού

Κόκκος γύρης

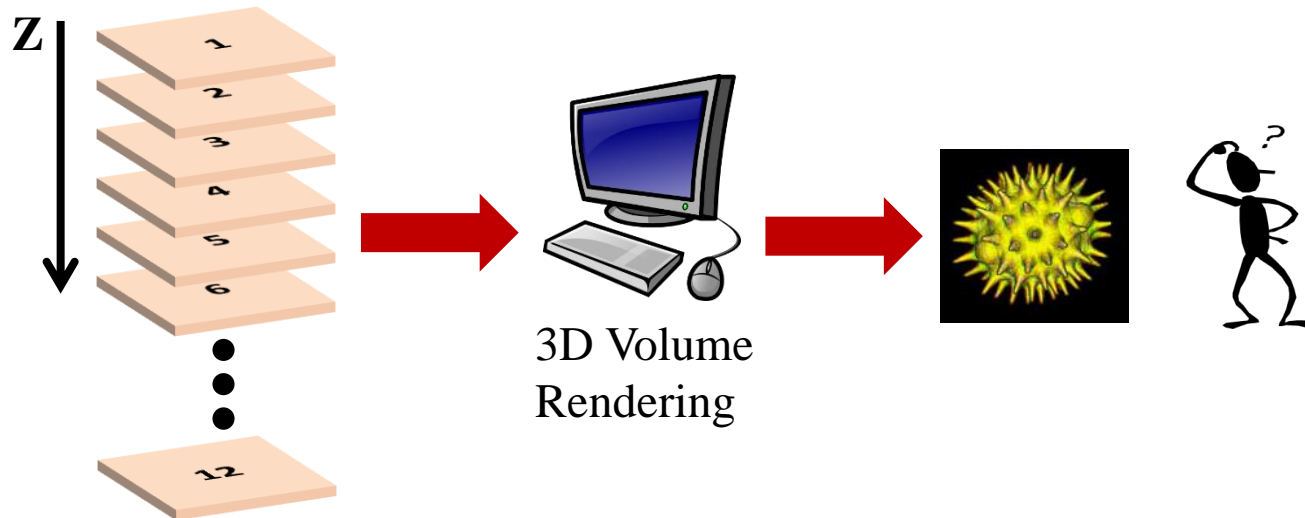


Σειρά οπτικών τομών (Z-Stack) ανά 3 μm



<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/>

<https://www.youtube.com/watch?v=eU9h0btUpzM>

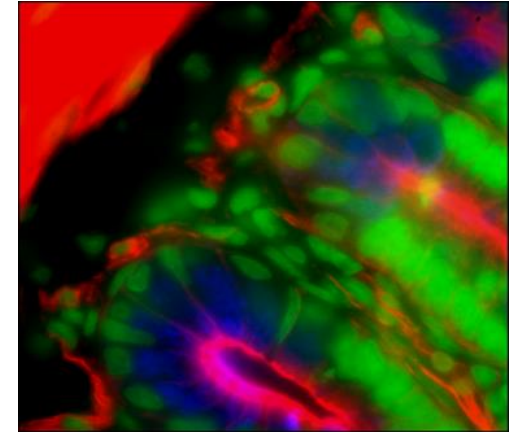
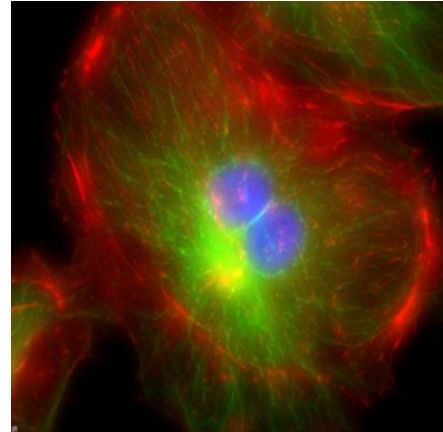
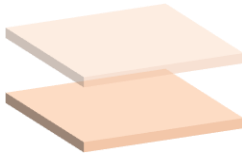


Πώς θα μπορούσαμε να πάρουμε οπτικές τομές στο μικροσκόπιο φθορισμού;

# Το πρόβλημα του φθορισμού εκτός εστιακού επιπέδου

Εικόνα #2

Εικόνα #1



Αντικειμενικός  
Φακός



Εστιακό  
επίπεδο



Δείγμα

<http://www.biology.wustl.edu/imaging-facility/specs-deltavision.php>

<http://bair.beatson.gla.ac.uk/pages1/technique/Fluorescence.htm>

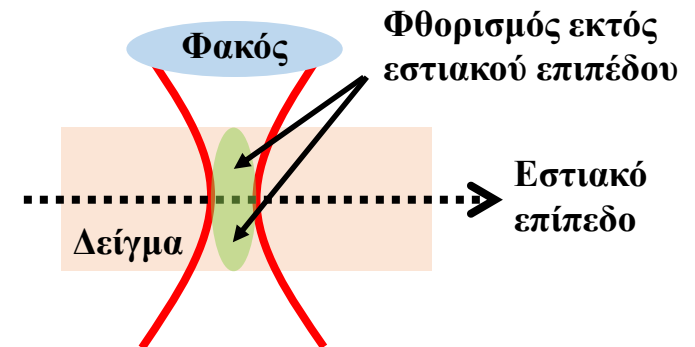


Οι εικόνες από τα απλά widefield μικροσκόπια είναι θολές λόγω του φθορισμού που προέρχεται εκτός του εστιακού επιπέδου

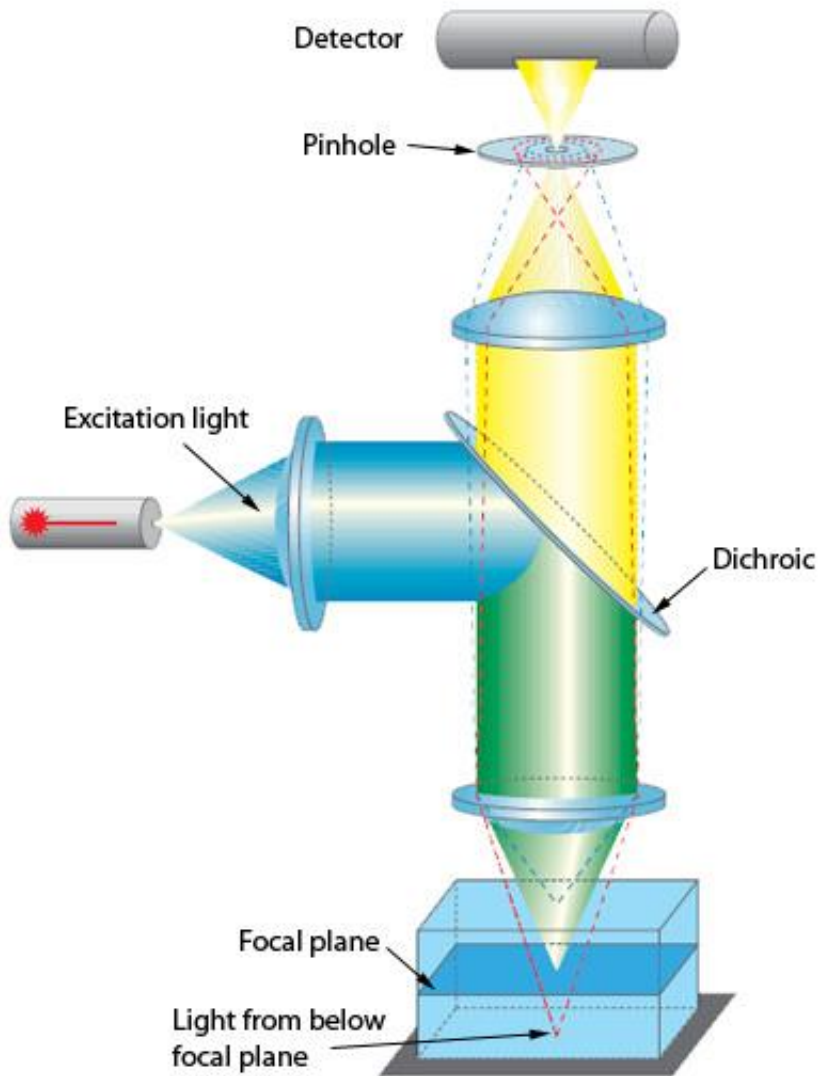
Κατακόρυφη  
μετακίνηση  
δείγματος



Πώς μπορούμε να αφαιρέσουμε το φθορισμό εκτός του εστιακού επιπέδου, ώστε να βελτιώσουμε την ποιότητα της εικόνας και να αποκτήσουμε ικανότητα λήψης μιας λεπτής οπτικής τομής;



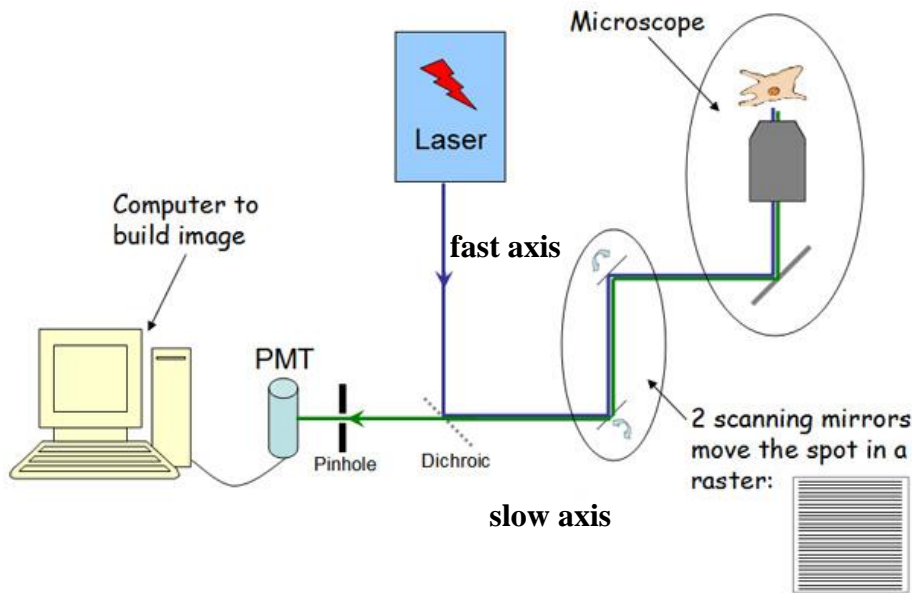
# Η λύση της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού



- Ακτινοβολία από λέιζερ προσπίπτει στο διχροϊκό κάτοπτρο και εστιάζεται από τον αντικειμενικό φακό στο δείγμα.
- Ωστόσο, ο φθορισμός που θα προκύψει προέρχεται και από περιοχές πριν και μετά το εστιακό επίπεδο (μπλε και κόκκινες ακτίνες αντίστοιχα).
- Ο φθορισμός περνά το διχροϊκό κάτοπτρο και εστιάζεται από ένα δεύτερο φακό διαμέσου μιας οπής (pinhole) με διάμετρο  $\sim 20-50 \mu\text{m}$ , η οποία βρίσκεται στην εστιακή απόσταση του φακού.
- Μόνο οι παράλληλες ακτίνες που προέρχονται από το εστιακό επίπεδο περνάνε μέσα από την οπή, ενώ οι υπόλοιπες (συγκλίνουσες ή αποκλίνουσες) αποκόπτονται αποτελεσματικά.
- Ο φθορισμός του εστιακού επιπέδου ανιχνεύεται από έναν PMT κάνοντας χρήση κατάλληλου οπτικού φίλτρου. Η σάρωση της δέσμης σημείο προς σημείο γίνεται τυπικά με galvo mirrors.

# Η λύση της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού

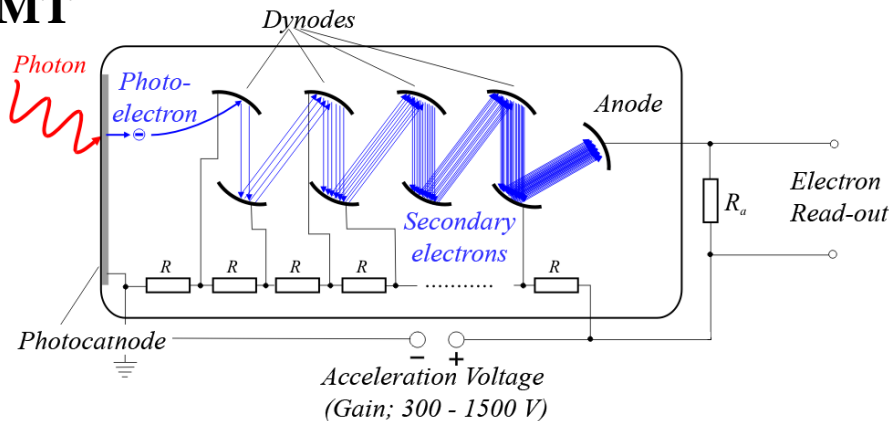
Σάρωση δέσμης μέσω galvo (scanning) mirrors στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού



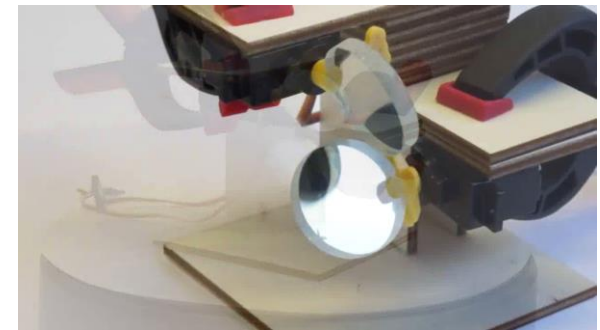
Για να πάρουμε μια καλή εικόνα στο συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο φθορισμού θα πρέπει να ρυθμιστούν σωστά τα εξής:

- Ένταση δέσμης διέγερσης
- Κατάλληλος αντικειμενικός φακός
- Παράγοντας zoom
- Μέγεθος pinhole: Μικρή διάμετρος οπής δίνει λιγότερο σήμα αλλά καλύτερη ανάλυση και αντίστροφα
- Παράγοντας gain στον PMT
- Παράγοντας averaging για βελτίωση λόγου σήματος προς θόρυβο
- Αριθμός pixels εικόνας

## PMT



## Galvo mirrors

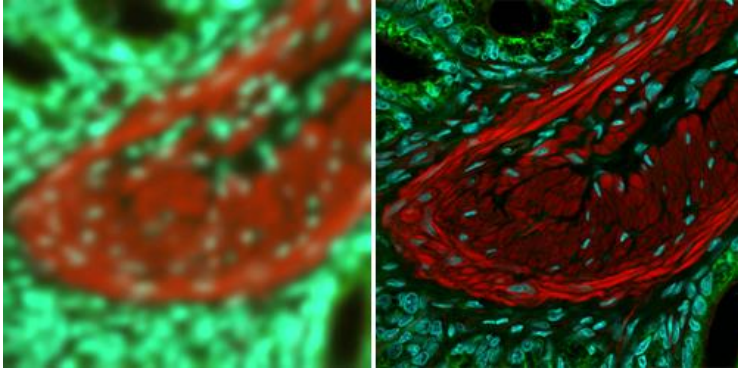


<https://www.youtube.com/watch?v=MUtxg7VziGE>

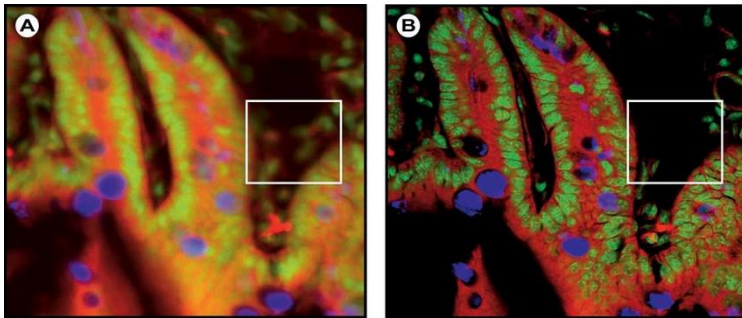


# Σύγκριση εικόνων widefield και confocal

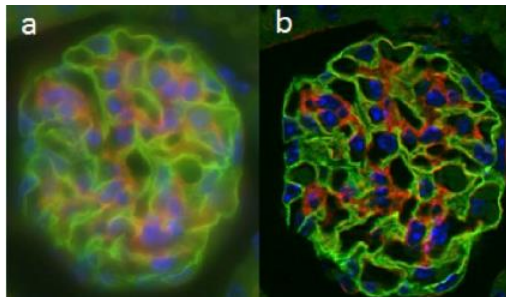
Images of 20  $\mu\text{m}$  thick mouse intestine section



Images of a triple-labeled mouse intestine section



Images of a 20  $\mu\text{m}$  thick mouse kidney section



## Πλεονεκτήματα συνεστιακής μικροσκοπίας:

- Συλλογή φωτός μόνο από το εστιακό επίπεδο
- Μεταβάλλοντας το εστιακό επίπεδο μπορούν να ληφθούν διαδοχικές οπτικές τομές σε βάθος από τις οποίες γίνεται 3Δ ανακατασκευή του δείγματος
- Βελτιωμένη αντίθεση λόγω εξάλειψης του φωτός εκτός εστιακού επιπέδου
- Μονοχρωματική διέγερση μέσω λέιζερ

## Μειονεκτήματα συνεστιακής μικροσκοπίας:

- Μείωση έντασης σήματος λόγω του pinhole
- Μειωμένος λόγος σήματος προς θόρυβο, συνεπώς μεγάλη ευαισθησία στον εξωτερικό οπτικό θόρυβο
- Ως τεχνική είναι πιο πολύπλοκη και απαιτεί περισσότερη εκπαίδευση και εμπειρία για τη λήψη ικανοποιητικών εικόνων

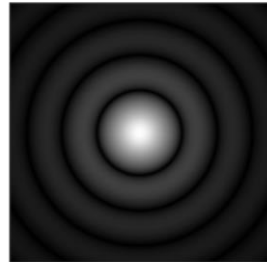
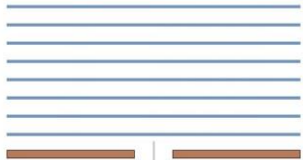
Ishikawa-Ankerhold et al, Molecules, 2012

<http://uacc.arizona.edu/research/shared-resources/tacmasr/microscopy/confocal>

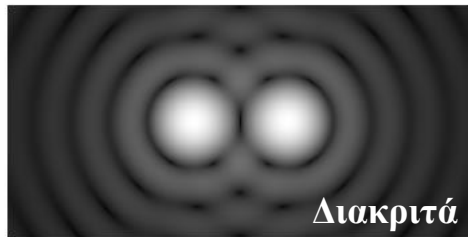
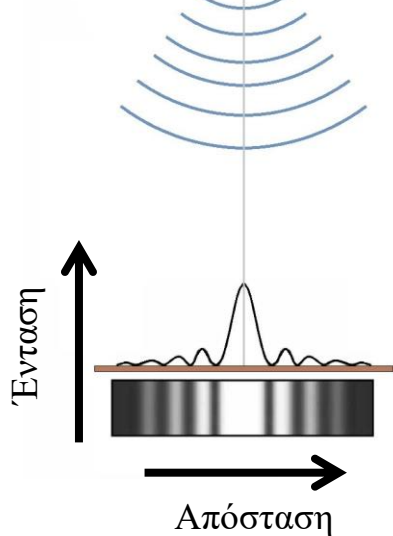
<https://www.mcgill.ca/abif/media-gallery/lightbox/621/80>

# Χωρική ανάλυση στη μικροσκοπία φθορισμού

Περίθλαση από σχισμή



Η περίθλαση μιας δέσμης φωτός από τα άκρα ενός φακού προκαλεί μια κατανομή έντασης στην εστία της που χαρακτηρίζεται από έναν φωτεινό δίσκο (Airy disk) ο οποίος περιβάλλεται από δακτυλίους μειούμενης έντασης.



**Κριτήριο Rayleigh:** Δύο σημειακά αντικείμενα μπορούν να διακριθούν οριακά όταν το περιθλαστικό μέγιστο του ενός ειδώλου συμπίπτει με το πρώτο ελάχιστο του άλλου

$$r = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

όπου  $r$  η ελάχιστη απόσταση μεταξύ των αντικειμένων (ανάλυση),  $\lambda$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και  $NA$  το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού.

# Χωρική ανάλυση στη μικροσκοπία φθορισμού

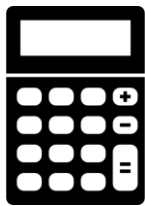


Ενώ στο widefield μικροσκόπιο η πλευρική ανάλυση δίνεται από το κριτήριο Rayleigh, στη συνεστιακή μικροσκοπία η αντίστοιχη ανάλυση παρουσιάζεται βελτιωμένη κατά ένα παράγοντα  $\sqrt{2} \approx 1.414$  λόγω χρήσης της οπής



Η αξονική ανάλυση της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι αντιστρόφως ανάλογη του αριθμητικού ανοίγματος (NA) του αντικειμενικού φακού

$$r_{\text{axial}} = 1.4 \frac{\lambda \cdot n}{NA^2}$$



$\lambda = 500 \text{ nm}$

$NA = 0.8$

$n = 1$



**Confocal:**

$r(\text{lateral}) = 0.27 \mu\text{m}$

$r(\text{axial}) = 1.1 \mu\text{m}$

**Widefield:**

$r(\text{lateral}) = 0.38 \mu\text{m}$

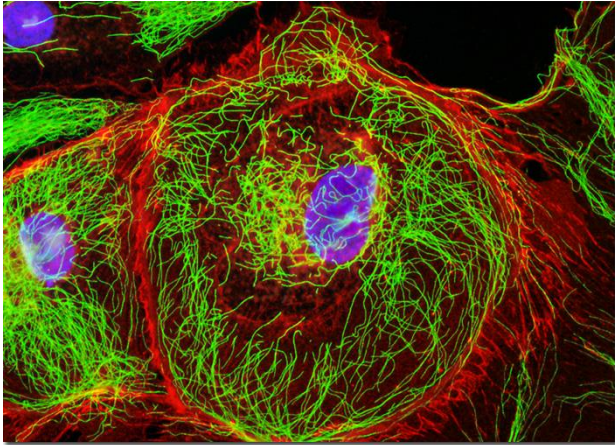


Για να εκμεταλλευτώ πλήρως τη διακριτική ικανότητα του συστήματος θα πρέπει το μέγεθος του pixel να είναι τουλάχιστον το μισό σε σχέση με την ανάλυση (κριτήριο Nyquist).

*Π.χ. Αν η ανάλυση του συστήματος είναι  $0.3 \mu\text{m}$ , το pixel size θα πρέπει να είναι τουλάχιστον  $0.15 \mu\text{m}$*

# Ποια ερωτήματα πρέπει να μπορούμε να απαντάμε;

Επιθηλιακά κύτταρα νεφρού ποντικού



<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/ptk2/ptk2cellsexlarge2.html>

- Τί είναι φθορισμός και πως αναπαρίσταται σε διάγραμμα Jablonski;
- Πώς λειτουργεί ένα widefield μικροσκόπιο φθορισμού;
- Ποια είναι τα βασικά είδη φίλτρων και διχροϊκών κατόπτρων;
- Ποιες είναι οι δύο τεχνολογίες φίλτρων και τι προσφέρει η κάθε μία;
- Τί είναι η φωτολεύκανση και πως μπορεί να αντιμετωπιστεί;
- Τι δυνατότητες προσφέρει το συνεστιακό μικροσκόπιο σε σχέση με το widefield;
- Ποια είναι η αρχή λειτουργίας της συνεστιακής μικροσκοπίας;
- Από ποιες σχέσεις δίνεται η χωρική ανάλυση ενός μικροσκοπίου φθορισμού λόγω περίθλασης και πως αυτές προκύπτουν;